

# KOPI

EH/KBN

Originalen befinn r 30  
seg hos rullmeklig n.

29. august 1991

B30

O.nr.C23702

"Nr. 3296/OA/NO"

BOEHRINGER MANNHEIM GMBH  
Sandhofer Strasse 112-132,  
Mannheim-Waldhof,  
Forbundsrepubl. Tyskland

Styret for det industrielle rettsvern	
Dato	Patentskknad nr.:
30. AUG 91	9 117 86

Oppf.:

Günther Schumacher, Kapellenweg 20, Bernried,  
Carola Dony, Waldschmidtstrasse 15, Starnberg,  
begge Forbundsrepubl. Tyskland

"Muteiner av granulocytt-koloni-stimulerende faktorer  
(G-CSF)."

Foreliggende oppfinnelse vedrører muteiner av granulocyttstimulerende faktorer G-CSF i sekvensen

50 51 52 53 54 55 56

5 Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile 1 posisjon 50 til 56 av moden G-CSF med 177 aminosyrer hhv. 1 posisjon 53 til 59 av moden G-CSF med 177 aminosyrer eller/og minst én av 4 His-rester i posisjon 43, 79, 156 og 170 av moden G-CSF med 174 aminosyrer, hhv. ved posisjon 46, 82, 159 eller 173 av moden G-CSF  
10 med 177 aminosyrer.

Lymfokiner er involvert ved modning av blodceller. De stimulerer modningen av benmargs-stamceller fra uddifferensierte celler. G-CSF blir syntetisert av aktiverte monocyter, makrofager samt fra en rekke andre cellelinjer.  
15

G-CSF ble renset til homogenitet fra cellekultursupernatanter fra menneskelig blærekarzinomcellelinje 5637 (Welte et al., Proc. Natl. Acad. Sci 82 (1985), 1526). Sekvensen til cDNA kodende for nativt G-CSF er beskrevet av Sunza et al.,  
20 Science 232 (1986), 61. Det eksisterer, på grunn av alternative spleisinger i andre intron, to naturlig forekommende former av G-CSF med 204 hhv. 207 aminosyrer, der de første 30 utgjør et signalpeptid (Lymphokiner, IRL Press, Oxford, Washington D.C., Herausgeber D. Male og C. Rickwood). Det  
25 modne proteinet har en molekylvekt på ca. 19,6 kD og har 5 cysteinrester som kan danne inter- hhv. intramolekulære disulfidbroer. Bindingsstudier har vist at G-CSF bindes til neutrofile granulocyttter. Ingen, eller bare liten, binding blir oppdaget av erytroider, lymfoider, eosinofile cellelinjer samt ved makrofager. G-CSF-reseptoren består av en eneste peptidkjede med en molekylvekt på 150 kD (Nicola, Immunol. Today 8 (1987), 134). Antallet reseptorer pr. celle  
30 avhenger generelt av modningen av cellen, og kan utgjøre noen 100 pr. celle. Man går ut fra at lymfokinreseptorene består av en ekstracellulær domene som binder ligandene, en hydrofob transmembranregion og en intracellulær domene. Binding av  
35

lymfokiner på deres reseptor kan bevirke syntese av cykliske nukleotider, hydrolyse av fosfatidylinositol 4,5-bisfosfat, samt aktivisering av proteinkinase C og forhøyning av det intracellulære kalsiumspeil t. Hvordan disse forløperne påvirker stoffskiftet til cellen er av stor interesse, men forstås bare i liten grad. Et ytterligere resultat av bindingen av en ligand på sin reseptor, kan være en vandrings- 5 av reseptorligandkomplekset inn i det indre av cellen gjennom en reseptoravhengig endozytose. Denne internaliseringen er også tydelige i lymfokiner (f.eks. G-CSF), men konsekvensen av stoffskiftet til cellen forstås derimot ikke. 10

På grunn av at G-CSF er i stand til å øke populasjonen av neutrofile granulocyter i løpet av kort frist, kan G-CSF anvendes innen mange forskjellige terapeutiske anvendelses- 15 områder. G-CSF kan dermed f.eks. etter kjemoterapi ifølge Krebs, der cellene i immunsystemet blir ødelagt, bli tilsatt. Videre kan man anvende G-CSF ved benmargstransplantasjoner ved store brannskår ved gjennom immunvekkede betingede opportunistiske infeksjoner og ved leukemi. For forskjellige 20 terapiformer er det ønskelig å utvikle mere aktive, men også mindre aktive former av G-CSF. Gjenstand for foreliggende oppfinnelse var dermed å utvikle gjennom målrettet innføring av punktmutasjoner, G-CSF-molekyler med et bredt aktivitetsspektrum. Denne aktivitetsendringen skal bli 25 oppnådd gjennom minst mulig endring av aminosyresekvensen.

Gjenstand ifølge oppfinnelsen blir løst gjennom en granulocytstimerende faktor (G-CSF) eller en G-CSF-variant, der 30 én eller flere av aminosyrene til sekvensen Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile i posisjon 50 til 56 av moden G-CSF er mutert med 174 aminosyrer hhv. i posisjon 53 til 59 av moden G-CSF med 177 aminosyrer eller/og minst én av 4 His-rester i posisjon 43, 79, 156 og 170 av moden G-CSF med 174 aminosyrer hhv. i 35 posisjon 46, 82, 159 eller 173 av moden G-CSF med 177 aminosyrer.

Overraskende fører innføring av nye aminosyrer til G-CSF-mut in r som har t bredt aktivitetsspektrum. Aktivitetsbestemmelsen kan eksempelvis foregå ifølge Biochem. J. 253 (1988) 213-218; Exp. Hematol. 17 (1989) 116-119; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 5010.

Begrepet G-CSF eller G-CSF-varianter ifølge foreliggende oppfinnelse innbefatter alle naturlig forekommende varianter av G-CSF med eller uten ledersekvens, samt avledet derfra, gjennom rekombinant DNA-teknologi, modifiserte G-CSF-proteiner, spesielt fusjonsproteiner, som ved siden av G-CSF-andelen inneholder ytterligere polypeptidsekvenser. Spesielt foretrukket er i dette henseende et G-CSF-mutein med en N-terminal Met-rest i posisjon -1, som for ekspresjon er egnet i prokaryotiske celler. Like foretrukket er en rekombinant metioninfri G-CSF-variant som kan bli fremstilt ifølge PCT/EP91/00192. Begrepet "mutert" betyr at gjeldende aminosyre er deletert eller fortrinnsvis substituert med en annen aminosyre.

Foretrukket er G-CSF-muteiner der én av de 7 aminosyrene fra sekvensen Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile er substituert med en annen aminosyre. Mere enn én, spesielt to aminosyrer kan bli utvekslet.

Spesielt foretrukket er et G-CSF-mutein der C-resten i posisjon 53 av moden G-CSF med 174 aminosyrer, hhv. i posisjon 56 av moden G-CSF med 177 aminosyrer er utvekslet med én av de 19 andre aminosyrene.

Spesielt foretrukket er det å substituere Leu-resten i posisjon 54 av moden G-CSF med 174 aminosyrer, hhv. i posisjon 57 av moden G-CSF med 177 aminosyrer med én av de 19 andre aminosyrene, spesielt med Thr. Derved oppnår man G-CSF-muteiner med en bred variasjon på G-CSF-aktiviteten.

Videre foretrukket er G-CSF-mutein med én av 4 His-restene i posisjon 43, 79, 156 eller 170 av moden G-CSF med 174 aminosyrer hhv. i posisjon 46, 82, 159 eller 173 av moden G-CSF med 177 aminosyrer er utvalgt med en annen aminosyre, spesielt Gln.

En gjenstand ifølge oppfinnelsen er videre et rekombinant DNA som koder for et G-CSF-mutein ifølge oppfinnelsen. En gjenstand ifølge oppfinnelsen er også en rekombinant vektor som minst inneholder en kopi av rekombinant DNA ifølge oppfinnelsen. Foretrukket er en rekombinant vektor som er egnet for genekspressjon i prokaryotiske celler. Vektorer av denne typen er kjent for fagfolk.

En gjenstand ifølge oppfinnelsen er videre en celle som er transformert med et ifølge oppfinnelsen rekombinant DNA eller/og en ifølge oppfinnelsen rekombinant vektor. Fortrinnsvis er denne cellen en prokaryotisk celle, spesielt foretrukket *E. coli*-celle.

En gjenstand ifølge oppfinnelsen er også en fremgangsmåte for fremstilling av et ifølge oppfinnelsen rekombinant DNA, der man stedsspesifikt mutageniserer en DNA-sekvens som koder for G-CSF eller en G-CSF-variant. Den vanlige molekylærbiologiske fremgangsmåten for stedsspesifikk mutagenese er kjent for fagfolk. Fortrinnsvis blir mutagenesen gjennomført under anvendelse av syntetiske oligonukleotider som mutagenese-primer på enkelttrådet DNA som matrise. Vanlige fremgangsmåter er f.eks. beskrevet i Amersham nr. 1523 "Oligonucleotide-directed in vitro mutagenesis system"; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) Vol. 154, Part E, 367-382 (1987); Analytical Biochemistry 179 (1989) 309-311.

En ytterligere gjenstand ifølge oppfinnelsen er en fremgangsmåte for isolering av et G-CSF-mutein ifølge oppfinnelsen, der man transformerer en celle med et ifølge oppfinnelsen rekombinant DNA eller/og en ifølge oppfinnelsen rekombinant

vektor, dyrke den transformerte cellen i et egnet medium og isolere proteinet fra cellen eller mediet. De vanligvis anvendte fremgangsmåtene innen molekylærbiologien for isolering av rekombinant proteiner fra eukaryote eller prokaryote celler er kjent for fagmannen, og trenger ikke å bli beskrevet i detalj.

En gjenstand ifølge oppfinnelsen er til slutt også et legemiddel på grunnlag av et ifølge oppfinnelsen G-CSF-mutein som virkestoff, eventuelt sammen med vanlige farmasøytiske bærer-, fyll- og hjelpestoffer. Et slikt legemiddel er spesielt egnet for overnevnte terapeutiske anvendelsesområder, men også for ytterligere terapeutiske fremgangsmåter, der dannelsen av neurotrofile granulocytter skal bli aktivert.

Følgende eksempler skal tydeliggjøre oppfinnelsen, men ikke innskrenke omfanget derav.

#### EKSEMPEL 1

##### Fremstilling av vektoren mgl-G-CSF-Bg

Fra vektor pKK 177-3 G-CSF-Bg (DSM 5867) blir det 554 bp lange EcoRI/BamHI-fragmentet med Shine-Dalgarno-sekvensen, ATG-kodon og den kodende sekvensen til G-CSF-genet klonet ved hjelp av en bånd-endet legering i NcoI-spaltningssstedet til vektoren pZ 07-mgl lac (W088/09373, figur 10). Gjennom inkubasjon med Mung-bønne-nuklease (Pharmacia) blir først ATG-startkodonet til lac Z-genet til denne vektoren, som etter NcoI-spaltning er overhengende enkelttråd, spaltet. Den resulterende vektoren blir betegnet mgl-G-CSF-Bg.

## EKSEMPEL 2

Mutagen av aminosyre Leu (X) i sekvensen Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile

5

Mutagenesen blir gjennomført ifølge den kjente teknikken ved M13-templat (Amersham nr. 1523 "Oligonukleotid-directed in vitro mutagenesis system").

10

I spaltningsstede BstXI/AatII blir et 251 bp langt G-CSF-cDNA-fragment isolert. Gjennom Mungbønne-nuklease (Pharmacia) blir den overhengende enkelttråden avspaltet og fragmentet klonet inn i vektor M13mp19, som var spaltet med EcoRI/SmaI. Den overhengende EcoRI-enden ble ifyllt for en buttendet

15

kloning. Etter preparering av enkelttrådet DNA blir oligonukleotidet hybridisert på enkelttrådet DNA og en forlenging i 5'→3'-retningen over oligonukleotidet under foranvendelse av Klenow-polymerase, ligase og de fire nukleotidtrifosfatene (GTP, CTP, TTP, ATP). Det nå dobbelttrådet DNA blir

20

transformert i E. coli-celler som bærer en F'-episom, slik at infeksjonen er mulig med filamentøse M13-fag (f.eks. JM101, oppnåelig fra Stratagene, LaJolla, California). Enkelt-

25

plaques blir plukket, og de deri inneholdende muterte M13-fag blir anvendt for preparering av enkelttrådet DNA. Ifølge kjente teknikker (f.eks. dideoksyfrengangsmåten til Sanger)

30

blir en DNA-sekvensering gjennomført, og dermed blir den nøyaktige utvekslingen til ønsket mutasjon undersøkt. Etter preparering av dobbelt-trådet-DNA, blir det muterte Aval-fragmentet til G-CSF isolert og kolonet inn i ekspressjonsvektor mgl-G-CSF-Bg (spaltet med Aval).

35

For å rekonstituere det fullstendige G-CSF-genet blir DNA til slutt spaltet med HindIII, overhengende ende ifyllt med Klenow-polymerase og deretter delvis spaltet med Aval, slik at 5'Aval-stedet i G-CSF-genet (ved ca. 130 bp) ikke blir spaltet. Dette DNA blir ligert med 240 bp store G-CSF-fragmentet Aval/BamHI (BamHI-setet ifyllt med Klenow-polymer-

ase) fra utgangsvektor mgl-G-CSF-Bg. Etter transformasjon i E. coli JM83 foregår ekspr sjon av G-CSF som beskr v t i W088/09373.

5 Anvendt cDNA oppviser en sekvens som koder for en G-CSF med 175 aminosyrer (uten signalsekvens, men med Met-resten i posisjon -1), slik at den foretrukne mutasjonen i Leu i posisjon 54 til G-CSF aminosyresekvensen (herved er den N-terminale Met-resten ikke innbefattet) blir satt.

10 Sekvensen til G-CSF-kodende cDNA som koder for aminosyrene 50 til 56 (med hensyn på G-CSF med 174 aminosyrer), lyder:

(X)

Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile

15 5'-CTC GGA CAC TCT CTG GGG ATC-3'

Den tilsvarende til mutageniserende komplementære motsatte tråd er:

20 5'-GAT GCC CAG AGA GTG TCC GAG-3'

Følgende 19 motsatte tråd tilsvarende oligonukleotider blir anvendt for rettet mutagenese:

25

30

35



Villtype:

5'→3

GAT GCC CAG AGA GTG TCC GAG 3'

M t

1. 5' GAT GCC CAT AGA GTG TCC GAG 3'

5

Phe

2. 5' GAT GCC GAA AGA GTG TCC GAG 3'

Gln

10 3. 5' GAT GCC CTG AGA GTG TCC GAG 3'

Glu

4. 5' GAT GCC CTC AGA GTG TCC GAG 3'

15

Asp

5. 5' GAT GCC GTC AGA GTG TCC GAG 3'

Cys

6. 5' GAT GCC GCA AGA GTG TCC GAG 3'

20

Ala

7. 5' GAT GCC GGC AGA GTG TCC GAG 3'

Gly

25 8. 5' GAT GCC AGG AGA GTG TCC GAG 3'

His

9. 5' GAT GCC GTG AGA GTG TCC GAG 3'

Ile

30

10. 5' GAT GCC GAT AGA GTG TCC GAG 3'

Lys

11. 5' GAT GCC CTT AGA GTG TCC GAG 3'

35

				Tyr	
12.	5'	GAT	GCC	ATA AGA GTG TCC GAG	3'
5				Asn	
13.	5'	GAT	GCC	GTT AGA GTG TCC GAG	3'
				Pro	
14.	5'	GAT	GCC	GGG AGA GTG TCC GAG	3'
10				Arg	
15.	5'	GAT	GCC	GCG AGA GTG TCC GAG	3'
				Ser	
15	16.	5'	GAT	GCC GGA AGA GTG TCC GAG	3'
				Thr	
17.	5'	GAT	GCC	GGT AGA GTG TCC GAG	3'
20				Val	
18.	5'	GAT	GCC	GAC AGA GTG TCC GAG	3'
				Trp	
19.	5'	GAT	GCC	CCA AGA GTG TCC GAG	3'
25					

## EKSEMPEL 3

Fremstilling av en G-CSF med forandret aktivitet

30 En sammenlignet med villtype enzymatisk mere aktiv G-CSF kan gjennom utveksling av serin i posisjon 53 bli fremstilt til en treonin i posisjon 53 av G-CSF med 174 aminosyrer (Serin ifølge Gly-His-Ser-Leu-Gly). For mutagene ble følgende

35 dobbelttrådede oligonukleotid anvendt:

## His Thr Leu Gly Ile

5' CCC GAG GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC ACC CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC 3'  
 3' C CTC GAC CAC GAC GAG OCT GTG TGG GAC CCG TAG GGG ACC CGA GGG GAC 5'

For kloningen ble G-CSF-cDNA-fragmentet (ca. 300 bp, EcoRI/EcoRV) fra Vektor pKK 177-3 G-CSF-Bg (DSM 5867/ inn i EcoRI/SmaI-spaltningssættet til vektoren pUC19 (Yannish-Perron et al. (1985), Gen 33, 103.

Dette DNA blir spaltet med AvaI/SacI og direkte ligert med overnevnte primer-par ifølge vanlig teknikk. Fra denne konstruksjonen kan det muterte BstIX/SacI-fragmentet bli isolert og klonet inn i vektor pKK 177-3 G-CSF-Bg (DSM 5867) (spaltet med BstXI/SacI). Den avsluttende fremstillingen av ekspresjonsklonen foregår analogt med eksempel 1. Aktivitetsbestemmelsen foregår som beskrevet i eksempel 5.

## EKSEMPEL 4

Forandring av de enzymatiske egenskapene til G-CSF gjennom mutasjon av aminosyrer som ikke ligger i aktivt sentrum.

Det blir antatt analogt med kjente serinesteraser at serinet fra det aktive sentrum med histidin inngår en vekselvirkning for dannelsen av en enzymatisk aktivitet. I sekvensen til G-CSF er fire histidiner tilstede i posisjon 43, 79, 156 og 170 (tallet fra 174 A.S. sekvensen uten signalpeptid). Histidinresten i posisjon 52 (hvh. posisjon 55 i den 177 aminosyre lange formen) blir ved mutagenesen ikke påvirket. Her blir His (CCA, CTA) erstattet med Gln (CAG). På motsatte tråd tilsvarer det for Gln-kodende kodonet sekvensen CTG.

Som beskrevet i eksempel 1, blir et G-CSF-fragment subklonet i M13mp19.

Følgende motsatt tråd tilsvarende oligonukleotider blir anvendt for mutagen se:

- 5 1. 5' GCT CCT GGG CTC GCA CAG C 3'  
Histidin 43 til glutamin 43
2. 5' GAA AAG GCC GCT CTG GAG TTG GCT C 3'  
Histidin 79 til glutamin 79
- 10 3. 5' GCT CTG CAG CTG GCC TAG CAA CC 3'  
Histidin 156 til glutamin 156
4. 5' GGG CTG CGC AAG CTG GCG TAG AAC G 3'

15 Analytikken og rekloning i en ekspresjonsvektor foregår analogt med eksempel 1.

20

#### EKSEMPEL 5

##### Bestemmelse av aktiviteten til G-CSF

25 Aktiviteten til G-CSF blir testet med murin leukjemilinen NSF60, som er fullstendig G-CSF-avhenig, som beskrevet i Biochem. J. 253 (1988) 213-218, Exp. Hematol. 17 (1989) 116-119, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 5010. For at faktoravhengigheten til cellen blir beholdt, inneholder 30 mediet (RPMI Medium, Boehringer Mannheim GmbH, Best. nr. 2099445 med 10% fetalt kalveserum) opprettholdelseskulturen permanent 1000 U/ml G-CSF.

I denne testen blir den G-CSF-stimulerende proliferasjonen av 35 NSF60-cellen målt gjennom innleiring av <sup>3</sup>H-tymidin. Gjennomføringen av testen foregår slik:

NSF60-celler som befinner seg i den eksponensiell vekstfasen (cell tetthet maksimalt  $1 \times 10^5$  celler/ml) blir overført i mikrotitrerplater ( $1 \times 10^4$  celler/Loch) og dyrket med ruserende G-CSF-konsentrasjon. Den maksimale dosen av G-CSF i Loch 1 tilsvarer konsentrasjonen i oppholdelseskulturen ( $1000 \text{ U/ml}$ , spesifikk aktivitet  $1 \times 10^8 \text{ U/mg protein}$ ). Fortynningen foregår i titall.

Etter inkubasjon i omtrent 24 timer foregår tilsetning av  $^3\text{H}$ -tymidin ( $0,1 \text{ } \mu\text{Ci/Loch}$ ). Deretter blir cellene inkubert i ytterligere 16 timer.

For vurdering av testen ble cellene frosset inn i mikrotiterplaten, slik at disse lyseres. Celle-lysatet ble suget på et glassfiberfilter, spylt, tørket og målt i scintillasjonteller. Innleiring av  $^3\text{H}$ -tymidin er proporsjonal med G-CSF-induserende proliferasjon av NSF60-celler.

#### EKSEMPEL 6

##### Endring av G-CSF-aktiviteten gjennom aminosyreutveksling i aktivt sentrum

En i aminosyreposisjon 54 modifisert G-CSF kan bli fremstilt gjennom utveksling av fortrinnsvis en leucin i posisjon 54 til en treonin i posisjon 54 (Leu ifølge Gly-His-Ser-Leu-Gly) tilsvarende den i eksempel 3 beskrevne fremgangsmåten under anvendelse av et egnet dobbelttrådet oligonukleotid som inneholder på tilsvarende posisjon en for aminosyre Thr kodende nukleinsyretriplett (f.eks. ACC). Posisjon 54 ved den 174 aminosyre lange formen av G-CSF tilsvarer der posisjonen 57 i den 177 aminosyre lange formen.

Aktiviteten til en mutant med 174 aminosyrer med Thr i posisjon 54, er i NSF60 celletest (se eksempel 5) sammen-

lignet med villtype G-CSF, redusert med 174 aminosyrer. Aktiviteten til disse G-CSF-mutantene er videre sammenlignet med en G-CSF-mutant med en aminosyre-utveksling i posisjon 53 redusert fra en serin til en treonin (beskrevet under eksempel 3).

10

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1.

Granulocytt-stimulerende faktor (G-CSF) eller G-CSF-varianter, karakterisert ved at én eller flere aminosyrer av sekvensen

5) <sup>50</sup>Leu-<sup>51</sup>Gly-<sup>52</sup>His-<sup>53</sup>Ser-<sup>54</sup>Leu-<sup>55</sup>Gly-<sup>56</sup>Ile <sup>57</sup> er mutert i posisjon 51 - 57  
 av moden G-CSF med 174 aminosyrer hhv. i posisjon 53 til 59  
 10 av moden G-CSF med 177 aminosyrer eller/og minst én av de 4  
 His-restene i posisjon 43, 79, 156 eller 170 av moden G-CSF  
 med 174 aminosyrer hhv. i posisjon 46, 82, 159 eller 173 av  
 moden G-CSF med 177 aminosyrer.

2.

15 G-CSF-mutein ifølge krav 1, karakterisert ved at det inneholder i posisjon -1 en N-terminal Met-rest.

3.

20 G-CSF-mutein ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at en aminosyre av sekvensen  
 Leu-Gly-His-Ser-Leu-Gly-Ile er substituert med en annen  
 aminosyre.

4.

30 G-CSF-mutein ifølge et av kravene 1 til 3, karakterisert ved at Ser-resten i posisjon 53 til  
 moden G-CSF med 174 aminosyrer hhv. i posisjon 56 av moden G-  
 CSF med 177 aminosyrer, er substituert med en annen  
 aminosyre.

5.

35 G-CSF-mutein ifølge krav 4, karakterisert ved at den andre aminosyren er Thr.

13.

Celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert m d et rekombinant DNA ifølge krav 10 eller/og en rekombinant vektor ifølg krav 11 eller 12.

5

14.

Celle ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en prokaryot celle.

10

15.

Fremgangsmåte for fremstilling av rekombinant DNA ifølge krav 10, k a r a k t e r i s e r t v e d at man stedsspesifikt mutageniserer en DNA-sekvens som koder for G-CSF eller en G-CSF-variant.

15

16.

Fremgangsmåte ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d at man anvender syntetiske oligonukleotider som mutagenese-primer.

20

17.

Fremgangsmåte for isolering av et protein med G-CSF-aktivitet ifølge et av kravene 1 til 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at man transformerer en celle med et rekombinant DNA ifølge krav 10 eller/og en rekombinant vektor ifølge krav 11 eller 12, dyrker den transformerte cellen i et egnet medium og isolerer proteinet fra cellen eller mediet.

25

18.

Legemiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder en eller flere G-CSF-muteiner ifølge et av kravene 1 til 9 som virkestoff, eventuelt sammen med vanlige farmasøytiske bærer-, fyll- og hjelpestoffer.

30

19.

Anvendelse av et G-CSF-mutein ifølge et av kravene 1 til 9 for immunterapi.

35